

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 02-032259

(43)Date of publication of application : 02.02.1990

(51)Int.Cl. G01N 33/531
G01N 33/536

(21)Application number : 01-146910 (71)Applicant : EASTMAN KODAK CO
(22)Date of filing : 12.06.1989 (72)Inventor : SNYDER BRIAN ANTHONY
HAROLD C WARREN III

(30)Priority

Priority number : 88 206257 Priority date : 13.06.1988 Priority country : US

(54) SPECIFIC BINDING COMPOSITION CONTAINING LOW PI PROTEIN OR CARBOHYDRATE, DIAGNOSTIC TEST KIT AND USE THEREOF

(57)Abstract:

PURPOSE: To realize highly sensitive diagnostic test by employing a specific binding composition containing a specific binding species and a water soluble protein having specific pI value or a carbohydrate.

CONSTITUTION: The invention is applied for detecting the presence of a target ligand in a biological specimen derived from a human or animal quickly. The ligand may be any chemical or biological substance where a corresponding receptor reacting specifically on the spot to form a composite is present. Typically, the ligand includes protein, peptide, mold, bacteria and their components although it is not restrictive. It is especially useful for detecting a carbohydrate extracted from a streptococcal antibody, e.g. streptococcal A, B, C or G group organism. Most preferably, streptococcal A antibody can be detected.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11) 特許出願公告番号

特公平7-31199

(24) (44) 公告日 平成 7 年 (1995) 4 月 10 日

(51) Int.Cl.⁶

G 0 1 N 33/531

識別記号

B

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

請求項の数 3 (全 7 頁)

(21) 出願番号 特願平1-146910

(22) 出願日 平成 1 年 (1989) 6 月 12 日

(65) 公開番号 特開平2-32259

(43) 公開日 平成 2 年 (1990) 2 月 2 日

(31) 優先権主張番号 2 0 6 2 5 7

(32) 優先日 1988 年 6 月 13 日

(33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 999999999

イーストマン コダック カンパニー
アメリカ合衆国, ニューヨーク 14650,
ロチェスター, ステイト ストリート
343

(72) 発明者 ブライアン アンソニー スナイダー
アメリカ合衆国, ニューヨーク 14626,
ロチェスター ハーベスト ドライブ
226

(72) 発明者 ハロルド チェスター ウォーレン, ザ
サード
アメリカ合衆国, ニューヨーク 14543,
ラッシュ, ストーンブルック ロード
390

(74) 代理人 弁理士 青木 朗 (外 3 名)

審査官 柏崎 康司

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 低 p I 蛋白質または炭水化物を含んでなる特異的バインディング組成物ならびに診断試験キットおよび使用方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 A) 特異的バインディング種と、 B) 1 種類もしくはそれ以上の、 5 を越える pI 値を実質的に全く有さない水溶性蛋白質および／または炭水化物との水性混合物であることを特徴とする特異的バインディング組成物。

【請求項 2】 A) リガンドまたはリガンドに対する受容体との反応性を有している特異的バインディング種と、 B) 1 種類もしくはそれ以上の、 5 を越える pI 値を実質的に全く有さない水溶性蛋白質および／または炭水化物との水性混合物である特異的バインディング組成物を含んでなることを特徴とする標的リガンド検出のための診断試験キット。

【請求項 3】 生物学的検体試料中の標準リガンドを検出する方法であって、下記の工程：

A. A) リガンドまたはその受容体に対する特異的バインディング種と、 B) 1 種類もしくはそれ以上の、 5 を越える pI 値を実質的に全く有さない水溶性蛋白質および／または炭水化物との水性混合物である特異的バインディング組成物を、標的リガンドを含むことが予測される生物学的検体試料と接触させ、前記リガンドと前記種との間に特異的バインディング複合体を形成する工程、そして

B. 前記検体試料中でリガンドの存在を示すものとしての前記複合体の存在を検出する工程、
を含んでなることを特徴とする生物学的検体試料中の標的リガンドの検出方法。

【発明の詳細な説明】

【産業上の利用分野】

本発明は、標的リガンドの検出方法における特異的バイン

3

ンディング種を含んでなる特異的バインディング組成物およびその使用に関する。また、その組成物を含む診断試験キットにも関する。本発明は、診断方法において有用である。

【従来の技術】

医業では、生物学的流体、細胞または組織中に存在する生物学的および化学的物質の迅速かつ正確な検出または定量についての調査および診断方法の必要性が依然として存在する。例えば、生物学的検体における薬剤、ホルモン、ステロイド、ポリペプチド、ヌクレオチド、プロスタグランジン、蛋白質、炭水化物または感染性生物体（細菌、カビまたはウイルス）の存在は、適切な診断または処置のために正確かつ迅速な方法で測定されねばならない。

例えば、特定のストレプトコッカス（Streptococcus）属に属するようなグラム陽性細菌に分類される生物体は、ヒトの病原体として知られている。グループAの微生物が、主にB型溶血性肺炎、猩紅熱、リウマチ熱、心臓病発症、糸球体腎炎、敗血性咽喉痛および産褥感染症を引き起こす原因となる。ストレプトコッカスAにより生ずる感染力の深刻な作用のため、その存在を早い段階で診断することが重要であり、そうすることで適切な処置方針をとることができる。換言すれば、感染因子を低濃度で検出できるように高感度アッセイを入手することが望まれる。

診断上の測定方法を提供する目的で、測定される生物学的または化学的物質（本明細書では「標的リガンド」または単に「リガンド」という）と受容体（前記物質と特異的に反応またはバインディングする分子）との間の特異的バインディング反応を利用する前記物質の単離同定について多種多様な方法が案出されてきた。リガンドとその対応する受容体との間の前記反応は、特異的バインディング反応として既知である。そのリガンドと受容体のいずれかが抗体であるとき、反応は免疫反応として既知である。かかる反応には1種以上のリガンドまたは受容体が関与し得る。

前記のような反応は、いろいろな方法で検出される。一般に、特異的バインディング反応に関与する1以上のものが検出し得るように標識される。すなわち、それが本来的に検出可能であるか、または検出可能な成分（例えば、酵素、放射性同位体、色原体または蛍光助剤）が何等かの方法でそれらに組み込まれたものが選ばれる。最近では、検出可能な成分として酵素を利用するアッセイ（例えば、ELISA）が多数存在する。これは一定の場合に、アッセイに必要な備品が最小限ですむ点で便利であり、ならびに感度が改善されているからである。

特異的バインディング反応を利用する多くの分析方法に内在する重要な課題の一つは、非特異的バインディング反応が起こることである。例えば、抗体または抗原のような特異的バインディング種は、それが特異的でない他

4

の蛋白質、炭水化物または化学的もしくは生物学的物質と無差別に反応する可能性がある。それらは、また相互に反応して共に凝集することにより、それらが特異的反応性を有する分子との特異的バインディングを阻害する可能性がある。さらに、アッセイがある種の固体支持体（例えば、膜、ガラス・チューブ、プレート、ビーズまたは繊維）を用いて実施される場合には、特異的バインディング種がその表面上の化学基のためにこれらの材料に非特異的バインディングする可能性もある。

特に、ポリアミド膜は、特異的バインディング種（例えば、抗体）との非特異的相互作用に対して感受性である。固体表面（例えば、ポリアミド）への非特異的バインディングは、カゼインまたはウシ血清アルブミンのような蛋白質でそれらを被覆することにより極小化し得ることが知られている。

これらの好ましくない非特異的反応の全てが、バックグラウンド障害（すなわち、不要な検出可能なシグナル）を生じてアッセイ感度を劣化させる（すなわち、低濃度検出性が劣る）。ヨーロッパ特許公開第0280560号公報には、凝集アッセイにおける非特異的相互作用が、これらのアッセイで使用される微多孔質膜を一定の低pI値の蛋白質または炭水化物で被覆することにより極小化され得ることが記載されている。

【発明が解決しようとする課題】

凝集アッセイで一定の改良がなされているにもかかわらず、ELISAまたはサイドイッチアッセイのような非凝集アッセイでは、同様に膜を被覆したものが低いバックグラウンドおよび高いアッセイ感度を同時には示さないことがわかった。一般に、酵素標識を使用するアッセイの感度は高いが、膜がたとえ被覆されるとしても好ましくないバックグラウンドが課題となるであろう。

低濃度のリガンドに対して高い感度を示し、しかも非特異的相互作用に由来する不要なシグナルの極小を示すアッセイを入手することが強く望まれる。

【課題を解決するための手段】

前述の課題は、本発明によれば、A) 特異的バインディング種と、B) 1種類もしくはそれ以上の、5を越えるpI値を実質的に全く有さない水溶性蛋白質および/または炭水化物との水性混合物である特異的バインディング組成物を使用するアッセイにより解決することができる。

本発明の特異的バインディング組成物は、標的リガンド検出用診断試験キット中に含めることができる。

本発明は、また、生物学的検体試料中の標準リガンドを検出する方法であって、下記の工程：

A) A) 特異的バインディング種と、B) 1種類もしくはそれ以上の、5を越えるpI値を実質的に全く有さない水溶性蛋白質および/または炭水化物との水性混合物である特異的バインディング組成物を、標的リガンドを含むことが予測される生物学的検体試料と接触させて特異的

バイディング複合体を形成する工程、そして
B. 前記検体試料中でリガンドの存在を示すものとしての
前記複合体の存在を検出する工程、
を含んでなることを特徴とする生物学的検体試料中の標
的リガンドの検出方法も提供する。

〔態様〕

本発明は、ヒトまたは動物宿主に由来する生物学的検体
における標的リガンドの存在を迅速に検出するのに使用
することができる。前述したように、このリガンドは、
その場で特異的に反応して複合体を形成する対応する受
容体が存在するすべての化学的または生物学的な物質で
あり得る。限定されるものでないが、代表的なリガンド
としては、蛋白質（例えば、酵素、抗体および抗原蛋白
質ならびにそれらの断片）、ペプチド、ポリペプチド、
ヌクレオチド、炭水化物、植物レクチン、毒素、ハプテ
ン、薬剤、ウイルス、カビおよび細菌ならびにそれらの
構成要素、さらに当業者に既知の他の物質が挙げられ
る。本発明は、特に連鎖球菌性（Streptococcal）抗
原、例えば連鎖球菌性A、B、CまたはG グループ生物体か
ら抽出される炭水化物の検出に有用である。最も好まし
くは、本発明によれば連鎖球菌（または、ストレプトコ
ッカス）性A抗原が検出可能である。

限定されるものでないが、これらをアッセイすること
ができる生物学的試料としては、全血またはその成分（血
清もしくは血漿）、咽喉または口に由来する唾液または
粘液、涙液、脊髄液、糞便、尿、膈分泌液、精液、ヒト
組織または器官の抽出物ならびにヒト乳汁が挙げられ
る。これらの検体は、適当な手段を使用して集めること
ができる。例えば、連鎖球菌性抗原の検出では、一般に
咽喉用綿棒がアッセイされる。

本発明の限定的な態様は、特異的バイディング種およ
び5を越えるpI値のものは実質的に全く有さない1以上
の水溶性蛋白質または炭水化物（以下に詳細に定義す
る）を含んでなる特異的バイディング組成物の使用で
ある。

本明細書の定義によれば、特異的バイディング種と
は、他の生物学的化合物に特異的バイディングし得る
いずれかの生物学的または化学的化合物をいう。前記種
が標的リガンドと特異的に反応する場合には、これらの
種はそのリガンドに対する受容体として知られている。
他方、これらの種はリガンドについての受容体である
（リガンド自体に対するものでない）化合物と特異的バ
イディングしてもよい。限定されるものではないが、
代表的な特異的バイディング種としては、抗体は、抗
原性物質（例えば、蛋白質および炭水化物）、ペプチ
ド、ポリペプチド、ヌクレオチド、ハプテン、薬剤、ホ
ルモン、アビジンまたはその誘導体、ビチオンまたはそ
の誘導体、レクチンまたはその誘導体および当業者に既
知の他のものが挙げられる。どのような特異的バイデ
ィング種が特定の標的リガンドまたは受容体と共に利用

されるかについては当業者には容易にわかるであろう。
好ましくは、特異的バイディング種は、検出可能なシ
ナグルを提供するために適当に標識される。標識は、分
子の生来の部分かまたはそれらに特別に付着した成分で
あってもよい。標識は、直接検出し得る、例えば、放射
性同位体、化学発光成分、リン光化合物、蛍光成分また
は色原体成分であって、さらに化学反応を伴うことなく
視覚的または適当な装置を使用して検出可能なものも挙
げることができる。た、間接的に検出し得る、例えば、
1以上の反応に関与して検出可能な種を与える酵素、ビ
オチンまたはアビジンを伴う標識であってもよい。

限定されるものでないが、より好ましくは、特異的バ
イディング種としては、ペルオキシダーゼ、アルカリホ
スファターゼ、ウレアーゼ、グルコースオキシダーゼお
よびβ-グルコシダーゼが挙げられる。ペルオキシダー
ゼおよびアルカリホスファターゼが好ましい。

標識化特異的バイディング種は、既知の方法を使用し
て調製することができる。殆んどは市販されている。市
販されていないものは、既知の方法〔例えば、「放射性
標識種の調製」についてのMethods in Enzymology, 9
2、免疫化学技術（Immunochemical Techniques）、277
ページ、LangoneおよびVan Vunakis編、1983、「ビオチ
ニル化種」についてのヨーロッパ特許公開第201,079号
公報ならびに米国特許第4,276,206号明細書、参照〕を
使用して調製される。一般に、酵素標識類は、酸素の誘
導、酵素誘導体の精製、その誘導体と抗体の反応、次い
で得られる接合体の精製および特性決定により調製され
る。各種の方法が次の文献に記載されている。すなわ
ち、Yoshitake, Eur. J. Biochem., 101, 395 (1979)、Nak
aneら、J. Histochemistry and Cytochemistry, 22, 1084
(1974) およびAvrameas, Bull. Soc. Chim. Biol., 50, 1169
(1968) である。

組成物中に存在する特異的バイディング種の量は、標
的リガンド、使用される色素形成性組成物（酵素標識が
使用される場合）、使用される個々の標識および個々の
アッセイにおける他のファクターに応じて変化し得る。
しかしながら、一般に少なくとも0.1 μg/ml、好ましく
は1~20 μg/mlの量で存在する。特異的バイディング
組成物における第2の重要な成分は、pI値が5以下の水
溶性蛋白質または炭水化物あるいはそれらの混合物であ
る。pI（または等電点）の語は、分子が電荷として中和
であるような分子中の正電荷と負電荷の数が等しいpHと
して知られている。蛋白質または炭水化物のpI値は、既
知の材料および方法を使用して測定することができる。
例えば、LKB Ampholine PAG plate (LKB-Produkter AB,
Bromma, Sweden, より入手可能)、pH範囲3.5~9.5およ
び標準検量器を使用する等電点電気泳動により測定する
ことができる。

本発明は、pI値が5を越える1以上の蛋白質または炭水
化物を少量（例えば、総蛋白質および炭水化物重量当た

7

り25重量%未満)有する組成物も包含することを意図する。従って、本発明の組成物中の蛋白質または炭水化物の全てが必ずしも低いpI値を有しなければならないものではないが、高いpI値を有する物質が多く使用される場合には、発明の利点が著しく損われることを覚悟しなければならない。特異的バインディング組成物では、pI値が5を越える蛋白質または炭水化物は、全く使用しないことが好ましい。

有用な水溶性低pI値蛋白質としては、カゼイン誘導体あるいは負に荷電される他の誘導体(例えば、カゼインのアシル化、アルキル化もしくはスルホン化により得られる誘導体)、例えば、スクシニル化カゼイン、グルタリル化カゼイン、スクシニル化ウシ血清アルブミン、スクシニル化コラーゲンならびに当業者に明らかな他のものが挙げられる。これらの材料は、適当な条件下で利用可能なアミン基を有する蛋白質をアシル化、アルキル化またはスルホン化することにより容易に調製される。利用可能なアシル化剤としては、限定されるものでないが、ジカルボン酸およびポリカルボン酸に由来する無水物、アシルハロゲン化物およびエステルのような米国特許第4,591,571号明細書に記載されるものが挙げられる。好ましいアシル化剤は、コハク酸無水物、グルタル酸無水物およびジメチルグルタル酸無水物を含む。コハク酸無水物が、特に好ましいアシル化剤である。スクシニル化カゼインの調製は、以下に記載される。限定されるものでないが、本発明で使用するための蛋白質変性において有用なアルキル化剤およびスルホン化剤としては、ブ

ロモ酢酸、クロロ酢酸、フルオロニトロベンゼン、m-(クロロスルホニル)安息香酸、プロモマレイン酸、プロモプロピオン酸およびp-(クロロスルホニル)安息香酸が挙げられる。

利用できる低pI値の炭水化物には、水溶性セルロース誘導体が含まれる。代表的な化合物は、カルボキシメチルセルロース、カルボキシエチルセルロースおよび当業者に容易に明らかとなる他のものである。これらのセルロース誘導体は、一般に市販されている。特異的バインディング種と混合して使用される好ましい材料は、スクシニル化カゼイン、グルタリル化カゼイン、カルボキシメチルセルロース、スクシニル化ウシ血清アルブミンおよびスクシニル化コラーゲンである。前述の水溶性蛋白質または炭水化物は、特異的バインディング組成物中、総組成物当たり少なくとも0.05重量%の量で存在するのが好ましい。より好ましくは、0.05~2重量%の量で存在する。

本発明の組成物は、一般に特異的バインディング種と適当な緩衝液(pH4~9)中の低pI値蛋白質または炭水化物の混合により調製される。任意の添加剤には、防腐剤、4'-ヒドロキシアセトアニリドおよび当業者に既知の他の物質のような電子移動剤が含まれる。本発明の代表的組成物を例1に示す。

8

本発明の組成物は、一般に特異的バインディング種と適当な緩衝液(pH4~9)中の低pI値蛋白質または炭水化物の混合により調製される。任意の添加剤には、防腐剤、4'-ヒドロキシアセトアニリドおよび当業者に既知の他の物質のような電子移動剤が含まれる。本発明の代表的組成物を例1に示す。

本発明の特異的バインディング組成物は、特異的バインディング種が特異的バインディングリガンドの有無または量は検出するために利用できるすべてのアッセイに使用することができる。例えば、アッセイは免疫メトリックアッセイ(また、「サンドイッチ」アッセイとして既知)、競合的バインディング、直接もしくは間接付着性アッセイ、または当業者に既知の他のアッセイであってよい。組成物における特異的バインディング種は、目的のリガンドに対する受容体であるか、またはかかる受容体である他の分子と特異的な反応性を有し得る。どちらの場合にも、前記種は標識化または未標識化され得、好ましくは前述のように標識化される。各アッセイは、当該技術分野で十分な例示があり、本明細書でこれ以上の詳細な説明は不要であろう。有用なアッセイは、溶液あるいは診断試験装置、分析要素、試薬ストリップまたは他の有用な製品中で実施することができる。

例示の目的で、残余の本説明は、捕集および濾過手段のような微多孔質膜を使用する連鎖球菌性抗原のようなリガンドに対するアッセイに向けられる。一般に、かかる膜はアッセイで用いられる全ての試薬および流体を受け取り保持し得る診断試験装置に組み込まれる。しかしながら、本発明はこれらの特定のアッセイまたは態様に限定されないことを理解しなければならない。

各種試験装置が、米国特許第3,825,410号、同3,888,629号、同3,970,429号および同4,446,232号明細書に記載されるものを含み当該技術分野で知られている。特に有用な装置は、ヨーロッパ特許公開第0308231号公報に記載されている。

より具体的には、試験装置は、生物学的検体試料および適当な試薬をそれぞれに収容することができる1以上の試験ウェルを有する水不溶性シェルを含んでなる。

シェルは、ガラス、高分子材、セラミック、繊維材、セルロース材および当該技術分野で既知の他の材料のようないずれかの有用な水不溶性材料から調製することができる。

好ましい態様では、試験装置が、検体試験の結果ならびに正対照、および負対照の結果を与えるように設計される3種類の試験ウェルを有する。各試験ウェルは、それらの中に取り付けられる微多孔質製品を有する。他の試験装置は、ヨーロッパ特許公開第0280558号公報に記載されている。有用な試験装置の他の変形物は、当業者の日常活動の範囲内に入るであろう。

一般的に、本発明の方法は、標的リガンドと本発明の特異的バインディング種との間で直接的または間接的に特

異的バインディング複合体を形成するように、本発明の特異的バインディング組成物を標的リガンドを含むことが予測される生物学的検体試料と接触させることにより実施される。前記リガンドおよび種は、その種がリガンドに対する受容体であるときには直接複合化し得る。また、前記種は、リガンドおよび相互にバインディングする1以上の他の特異的バインディング分子を介して前記リガンドと二次的に複合化されてもよい。例えば、リガンドが受容体と直接複合化され、次いでこの特異的バインディング種が、また受容体と反応してもよい。

前記リガンドと種との間の接触は、いずれかの適当な方法により達成できるが、好ましくは、検体が試験装置中で前記種と混合される。

この接触の前後または同時に、この反応が標的リガンドと前記種の反応を妨害しない限り、標的リガンドまたは特異的バインディング種を他の特異的バインディング化合物と複合化することができる。このような状態は、一つが標識されもう一つが標識されていない2種類の受容体分子（同一または異なる）とリガンドが複合化する免疫メトリックアッセイを含むことができる。この標識されていない受容体は、不溶化することができるか、またはアッセイの遅い時点で不溶化することが可能である。また、リガンドを固体支持体に直接付着し、次いで標識化受容体と反応させるか、または標識されていない受容体と反応させた後、その最初の受容体に対する酵素標識化受容体と標識されていない受容体を反応させる直接的なバインディングアッセイであってもよい。

アッセイにおいて形成される複合体が、次に適当な手段により検出される。例えば、複合体は、それが流体および複合化されていない物質から分離される場合、検出される凝集物を形成するならば視覚的に検出され得るであろう。好ましくは、前記種が適当な手段で標識化され、そして適当な装置および試薬を使用して検出可能なシグナルが生ずる。放射性同位体性標識は、複合化合物における1分当たりのカウントを測定することにより検出することができる。他の標識には、色素、化学発光または別のシグナルを発生する何等かの試薬および反応が必要となろう。

より好ましくは、酵素標識およびその酵素と反応して色素を与える適当な試薬を含む色素供給性組成物を使用して複合体が検出される。標識の種類は、色素を供給するために使用される試薬を決定し得るであろうし、当業者は適当な色素供給性組成物をいかにデザインすべきかが容易にわかるであろう。色素は、基質と酵素の単一反応または一連の反応を通して供給することができる。

得られる色素は、視覚的に観察するか、または適当な分光光度計を使用して測定することができる。

ペルオキシダーゼが好ましい酵素標識であり、基質または基質形成性反応ならびに色素形成性反応体を含む多数の適当な色素形成性組成物が知られている。基質それ自

体が、ベンジジン、テトラメチルベンジジンもしくは他のベンジジン誘導体、2,2'-アジノージー（3-エチルベンズチアゾロン-6-スルホン酸）、フェノールレッド、o-フェニレンジアミン、ピロガロール、4-アミノアンチピリン、プロモピロガロールレッドおよび当該技術分野で既知の他のものごとき色素形成性化合物であってもよい。また、水素供与体および電子受容体を組み合わせ検出可能な種を供給することもできる（例えば、米国特許4,260,679号明細書参照）。

- 10 好ましくは、色素形成性組成物は、過酸化水素およびペルオキシダーゼの存在下で色素を供給するロイコ染料〔例えば、米国特許第4,089,747号明細書に記載されるようなトリアリールイミダゾールロイコ染料または同第4,670,385号明細書に記載されるようなトリアリールメタンロイコ染料〕を含む。

本発明の診断試験キットは、本発明の酵素標識化特異的バインディング組成物ならびに適当な色素供給組成物を含む。これらのキット要素は、適当な手段でパッケージされ、液体または固体試薬のバイアルまたはボトルを区分して入れることができるある種のキャリアー中に入れることができる。さらに、前記方法を実施する上で有用な次の、試験装置、抽出試薬（アッセイに先立ってリガンドを抽出しなければならない場合）、洗浄液、希釈剤、さらなる受容体分子および当業者に既知の他の試薬、の1種類以上を含んでもよい。試薬は、乾燥状態または適当な溶液として供給することができる。キットの非反応性構成部品には、説明書、混合容器、攪拌器およびピペットなを含めてもよい。

- 20 以下の例は、本発明の実施例の代表的なものであるが、本発明を限定することを意図するものでない。

〔材料〕

ロイコ染料は、2-(4-ヒドロキシ-3,5-ジメトキシフェニル)-4,5-ビス(4-メトキシフェニル)イミダゾールを用いて次のように調製した；

- 30 固体ロイコ染料（0.1%の溶液を調製する目的で）を、リン酸ナトリウム緩衝液（5ミリモル濃度）中20%のポリ（ビニルピロリドン）溶液中に溶解した。次に、この溶液を過酸化水素（10ミリモル濃度）、4'-ヒドロキシアセトアニリド電子移動剤（0.7ミリモル濃度）およびジエチレンジアミンペンタ酢酸キレート剤（10マイクロモル濃度）を含むリン酸ナトリウム緩衝液に加え、最終濃度1%のポリ（ビニルピロリドン）および0.005%のロイコ染料とした。

スクシニル化カゼインは、カゼインと等重量のコハク酸無水物を25℃で4時間反応させ、次いで生成物を透析で精製することにより調製した。

ロプロディン（LoProdyne®）ナイロン製微多孔質膜は、Pall Corpから入手し、使い捨て用試験装置の試験ウェル中に取り付け、次いでFluoradFC135界面活性剤（0.05g/m²）で前処理した。

11

例1:特異的バインディング組成物

本例は、本発明により調製される好ましい特異的バインディング組成物を例示する。この組成物は、市販先より入手した免疫精製ラビットポリクロナル抗体およびYoshitakeら、Eur. J. Biochem. 101, 395 (1979)に記載される方法によってMiles Laboratoriesから入手したワサビペルオキシダーゼを使用して調製した抗-ストレプトコッカスA-ペルオキシダーゼ標識化接合体を含む。この接合体をスクシニル化カゼイン (pI 4.5、0.5~1.5重量%)、0.1モル濃度の4-モルホリノプロパンスルホン酸緩衝液 (pH 7.5)、10ミリモル濃度の4'-ヒドロキシアセトアニリドおよび0.01重量%の防腐剤と混合した。

例2:ストレプトコッカスA抗原についてのアッセイ

本例は、生物学的検体中のストレプトコッカスA抗原を検出するための本発明の方法における例1の組成物の使用を例示する。

ストレプトコッカスA抗原は、培養微生物を添加する前に酸性共試薬に水性亜硝酸ナトリウムを混合する標準的な亜硝酸抽出法を使用してグループAストレップ (strept) 培養物から得た。次に、抽出流体に過剰の緩衝液を添加することにより中和した。グループAの炭水化物抗原は、酸性エタノールおよびアセトンを使用し、上澄を廃棄しそして0.85%生理食塩水中にペレットを再懸濁して得られた。ラムノースの濃度は、DischeおよびShattlesworth, J. Biol. Chem. 175:595-603 (1948)の方法により測定された。この濃厚物を、クエン酸 (10 μ l、1.2モル濃度)、亜硝酸ナトリウム (120 μ l、8モル濃度) および4-モルホリノプロパンスルホン酸緩衝液 (120 μ l、1モル濃度、pH 7.5)を含む中和抽出液中に再懸濁した。

前述したような微多孔質膜を、2つの使い捨て試験装置の各3つの試験ウェル中に取付けた。コポリ [スチレン/メおよびp-(2-クロロエチルスホニルメチル)-スチレン] ビーズ [グリシン緩衝液 (0.1モル濃度、pH 8.5) 中5重量%のポリ (アクリルアミド) および0.0005重量%の蛍光増白剤を含む固体1%の懸濁液 2 μ l] から成る特異的バインディング試薬分散体を、検体試験ウェルとして扱われる試験ウェルにおける膜の中心部に添加した。そのビーズに、ストレプトコッカスA抗原に対するラビットポリクロナル抗体を共有結合させた。第二の試験ウェル (負対照ウェルとされる) は、ポリ (アクリルアミド) (グリシン緩衝液中5重量%) と蛍光増白剤を混合したラビットガンマグロブリン (1重量%) を付着した同一のポリマービーズの乾燥分散体 (2 μ l) を含ませた。この分散体を膜の中心部に適用した。

第三の試験ウェル (正対照ウェルとされる) は、ポリ (アクリルアミド) (グリシン緩衝液中5重量%) 中の前記乾式分散試薬 (2 μ l)、蛍光増白剤およびストレ

12

プトコッカスA抗原20 μ g/mlを含ませた。この分散体を膜の中心部に適用した。

抗原抽出液200mlを、検体試験ウェルだけに添加して貫流した。

例1に記載したペルオキシダーゼ標識接合体を含有する溶液 (40 μ l) をすべてのウェルに添加して貫流した。次に、この使い捨て装置を室温で1~2分間インキュベーションした。

すべてのウェルにリン酸ナトリウム緩衝液 (0.1モル濃度、pH 7.2) 中デシル硫酸ナトリウム (70ミリモル濃度) 含む洗浄液適用して一杯にし、貫流した。

前述のロイコ染料 (120ml) をすべてのウェルに添加し、室温で2分間インキュベーション後試験ウェル中に得られる色素を測定した。抽出抗原が適用された検出ウェルは、そのウェルの中心部い色素のないその周囲と明瞭に区別できる赤色を示した。負対照ウェルは全く着色を示さないにもかかわらず正対照ウェルは赤色を示した。このことは、本アッセイにより抗原の検出に成功したことを示す。

例3:標識化抗体を伴う各種蛋白質を使用する比較例
ストレプトコッカスA抗原は、例2に記載されるように得た。

前述したように膜を含む使い捨て装置を、本アッセイで使用した。試験ウェルの中心部にポリオール (アクリルアミド) (0.1モル濃度のグリシン緩衝液中5重量%、pH 8.5) と混合した例2で使用するようなポリマービーズの懸濁液 (2 μ l、1%の固形分) を添加した。続いて、抽出抗原試料 (200 μ l、2.9ng/ml) を試験ウェルに添加した。

この試料により4種の特異的バインディング種を試験した。

(1) 4-モルホリノプロパンスルホン酸 (0.1モル濃度)、4'-ヒドロキシアセトアニリド (10ミリモル濃度) および0.1重量%のチメロサル防腐剤中、抗-ストレプトコッカスA抗体 (9 μ g/ml)、0.5重量%スクシニル化カゼイン (pI 4.5)。

(2) スクシニル化カゼインに代えカゼイン (pI値は5を越える) を使用する以外は組成物 (1) に同じ。

(3) スクシニル化カゼインに代えウシ血清アルブミン (pI値は5を越える) を使用する以外は組成物 (1) に同じ。

(4) スクシニル化カゼインを含まない以外は組成物 (1) に同じ。

各組成物 (40 μ l) を、前記試験装置の試験ウェルに添加し、室温で2分間インキュベーションした。次に、膜をリン酸ナトリウム緩衝液 (0.1モル濃度、pH 7.2) 中にデシル硫酸ナトリウム (1.8重量%) を含む洗浄組成物で洗浄した。

例2に記載したロイコ染料組成物 (40 μ l) を添加し、その使い捨て装置を室温で2分間インキュベーション

13

し、次いで分光光度計を使用して反射濃度を測定した。反射濃度を透過濃度(Dr)に換算した結果を次の表に示す。

表

組成物	Dr	
	試験	バックグラウンド
(1)	0.101	0.005
(2)	0.024	0.005
(3)	0.089	0.026
(4)	0.185	0.185

データは、スクシニル化カゼインを含む組成物(1)のみが、最も低いバックグラウンドを伴う高感度(最高の染料シグナル)を与えることを示す。

低pI値の蛋白質を塗布した膜を使用するアッセイとの比較

試験アッセイは、アッセイに使用される膜が低pI値の蛋白質で前処理されているヨーロッパ特許公開第0280560号公報(前述)の説明に沿って、ストレプトコッカスA抗原の検出についての例2と同様に実施した。

膜は、Pall Corpからイムノジン(Immunodyne®)ナイロン微多孔質膜として市販されている。それをスクシニル化カゼインで塗布した。

14

アッセイの結果は、Dr0.101を示したが、バックグラウンドも同様に高かった(Dr0.037)。このことは、低pI値の蛋白質または炭水化物を膜上に設置することが、それを標識化特異的バインディング種組成物に添加するほど好ましくはないことを示す。

〔発明の効果〕

本発明は、特異的バインディング種(例えば、標識化抗体)を使用して高感度を有する診断試験を可能にする組成物を提供する。アッセイの改良された感度は、特異的バインディング種を5を超えるpI値のものは実質的に全く有さない1以上の水溶性蛋白質または炭水化物と混合して使用することにより達成される。特に、これらの蛋白質および炭水化物は、高いpI値を有する類似の蛋白質および炭水化物(例えば、カゼインまたはウシ血清アルブミン)の使用に比べると、感度に悪影響を受けることなくアッセイのバックグラウンドを効果的に低下する。特異的バインディング種と前記蛋白質または炭水化物を混合することは、アッセイで使用する膜または他の固体表面上にそれを塗布するものに比べて、それら自体、固体表面または目的のものでない他の蛋白質もしくは炭水化物とその種との非特異的相互作用が減少する。

フロントページの続き

(56)参考文献 特開 昭61-43987(JP, A)

J. Immunol. Methods, 111(2), P. 157-166, (1988)

J. Immunol. Methods, 103(1), P. 1-8, (1987)

Chem. Phys. Lipids., 38(1-2), P. 195-204, (1985)

福岡医誌, 72(6), P. 350-367, (1981)